

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.1:547.963.32: 577.352.3

НЕОГЛИКОКОНЬЮГАТЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ

М.А. Маслов[@], профессор, Н.Г. Морозова, доцент

Кафедра химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского
МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия

[@]Автор для переписки, e-mail: mamaslov@mail.ru

В данном обзоре рассмотрены вопросы, связанные с конструированием адресных липидных систем доставки нуклеиновых кислот. Особое внимание уделено липофильным неогликоконъюгатам, которые используются в качестве адресного модуля системы доставки и способствуют направленному переносу ДНК, РНК и олигонуклеотидов в клетки печени или дендритные клетки.

Ключевые слова: липосомы, неогликоконъюгаты, нуклеиновые кислоты, направленная доставка, генная терапия.

NEOGLYCOCONJUGATES FOR THE DELIVERY OF NUCLEIC ACIDS INTO EUKARYOTIC CELLS

M.A. Maslov[@], N.G. Morozova

M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies,
Moscow, 119571 Russia

[@]Corresponding author e-mail: mamaslov@mail.ru

A development of stable and safety non-viral transport systems for delivery of therapeutic nucleic acids (NA) into the target cells is one of the problem of gene therapy. Cationic liposomes are promising delivery systems capable to transfer various kind of NA. However, the wide application of cationic liposomes for gene therapy purposes is limited by their low efficiency and unspecific NA delivery into cells. These drawbacks are related to the presence of different biological barriers for lipoplexes: the instability in biological fluids, the interaction with blood serum proteins, plasmatic and nucleic membranes and endosomal degradation. Modular gene delivery systems introduced ten years ago consist of different lipophilic modules that mediate environmental and cellular receptors interactions as well as intracellular trafficking. Modular systems containing synthetic neoglycolipids are widely used for development of targeted gene delivery based on specific carbohydrate-lectin interactions (glycotargeting). This review combines examples of neoglycolipids used as active components of cationic liposomes. Targeted delivery of plasmid DNA, mRNA, oligonucleotides and small interfering RNA into hepatocytes, Kupffer cells and dendritic cells are discussed.

Keywords: liposomes, neoglycoconjugates, nucleic acids, targeted delivery, gene therapy.

1. Введение

Генная терапия – новый метод лечения наследственных и приобретенных заболеваний, направленный на устранение генетических дефектов или придания клеткам новых функций [1, 2] путем введения в них терапевтических нуклеиновых кислот (НК). Биофармацевтические препараты на основе НК могут контролировать развитие болезни на уровне активации или ингибирования действия генов, ответ-

ственных за ее развитие. В качестве терапевтических НК могут выступать плазмидные ДНК, антисмысловые олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК, рибозимы, ДНК-энзимы и аптамеры. Основными проблемами данного метода лечения являются эффективная доставка НК в клетки-мишени (трансфекция), а также создание условий для их длительного функционирования [1–3].

Начиная с 1990-х годов, разрабатываются невирусные системы доставки НК на основе катионных

амфифилов и липосом, а также полимеров, которые являются альтернативой вирусным системам доставки [1, 4–10]. Катионные амфифилы (КА) и липосомы (КЛ), полученные на их основе, имеют ряд преимуществ перед вирусными носителями: они неинфекционны и неиммуногенны, способны переносить НК большого размера, их легко получать, они стабильны при хранении и экономически доступны. Совокупность вышеперечисленных свойств делает КЛ перспективными транспортными системами для доставки НК в эукариотические клетки. Липидные ДНК/РНК-препараты рассматриваются как перспективные фармакологические агенты для лечения онкологических заболеваний, неврологических расстройств (болезни Паркинсона и Альцгеймера), а также терапии сердечно-сосудистых заболеваний [1, 11].

Метод доставки НК в составе комплексов с КЛ называется липофекцией и включает несколько этапов, суммарно определяющих эффективность всего процесса трансфекции. Для осуществления липофекции клеток необходимо приготовить комплексы НК и катионных липосом (липоплексы), которые образуются за счет электростатических взаимодействий между положительно заряженной группой КА и отрицательно заряженной фосфатной группой НК. В результате такой спонтанной самоассоциации в наноразмерные липоплексы НК оказывается защищенной от разрушающего действия нуклеаз. Липоплексы разнообразны по своей структуре и размеру, причем данные параметры определяются типом используемого КА, количественным соотношением НК и катионных липосом, а также способом их приготовления [12].

Первым этапом липофекции является добавление комплексов к эукариотическим клеткам, их взаимодействие с клеточной мембраной и проникновение внутрь клеток. Использование избытка КЛ (количественное соотношение липосом и НК определяется как отношение N/P – отношение числа положительно заряженных атомов азота КА к числу отрицательно заряженных фосфатных групп НК) придает поверхности липоплекса положительный заряд, что способствует взаимодействию комплекса с отрицательно заряженной мембраной клетки. Агрегированные на клеточной поверхности липоплексы проникают внутрь клетки посредством эндоцитоза, кроме того, часть комплексов может остаться невогребованной на поверхности клетки. Следующим этапом является высвобождение липоплекса и НК в его составе из эндосом в цитоплазму прежде, чем НК подвергнется деградации в поздних эндосомах и лизосомах. На конечном этапе происходит диссоциация липоплекса под действием различных полианионных молекул, находящихся в цитоплазме. Дальнейшая судьба доставляемой терапевтической НК будет зависеть от

ее типа. В случае малых интерферирующих РНК и антисмысловых олигонуклеотидов высвобождение в цитозоль является завершающей стадией процесса трансфекции, а для плазмидной ДНК и антигенных олигонуклеотидов понадобится транспорт данных НК в ядро клетки и, в случае ДНК, ее экспрессия.

Для успешного выполнения всех этапов липофекции помимо характеристик самих липоплексов необходимо учитывать наличие внешних и внутренних барьеров [13]. К внутренним барьерам относятся эндосомальная и ядерная мембраны. Исследования выявили, что липоплексы проникают в клетку в основном путем эндоцитоза [14], который может реализовываться по различным механизмам: клатрин-опосредованный эндоцитоз (адсорбционный или рецептор-опосредованный), кавеолин-опосредованный эндоцитоз, фагоцитоз, макропиноцитоз [15]. Было установлено, что механизм проникновения зависит от типа используемых КЛ, типа трансфицируемых клеток, а также от размера комплексов. Относительный вклад каждого способа в проникновение липоплексов через плазматическую мембрану до сих пор изучен недостаточно. Под внешними барьерами подразумевают нестабильность липоплексов в кровотоке, а также низкую степень взаимодействия с целевыми клетками-мишенями. Системное введение положительно заряженных липоплексов и их последующее взаимодействие с белками крови, такими как опсонины, альбумин, липопроотеины высокой и низкой плотности, могут привести к ряду неблагоприятных побочных явлений: от разрушения липоплексов и инактивации НК до запуска иммунного ответа через активацию системы комплемента [12]. Поэтому разработка стабильных и нетоксичных транспортных систем, которые смогут инкапсулировать и доставлять терапевтические НК в специфические типы клеток с эффективностью, сравнимой с вирусными векторами, является актуальной задачей биоорганической химии, молекулярной биологии и генной терапии.

Известно, что липосомы способны накапливаться в патологически измененных тканях (например, опухолях) благодаря пассивному нацеливанию. Несмотря на то, что такое нацеливание является основным подходом в терапии онкологических заболеваний, оно имеет ряд недостатков, связанных с возможным развитием множественной лекарственной устойчивости [16] и с нарушением проницаемости опухолевых тканей. Для решения проблемы направленной доставки НК необходимо создавать липосомы, которые после проникновения из сосудов в ткани будут способны связываться с рецепторами, расположенными на поверхности клеток. Это связывание может быть достигнуто введением в состав липосом липофильных молекул, содержащих в

своей структуре адресные лиганды, способные с высокой селективностью связываться с рецепторами, сверхэкспрессирующимися в клетках-мишенях.

Существование и детальное выяснение лимитирующего действия всех внутриклеточных и внеклеточных барьеров стимулировало разработку систем доставки, которые эволюционировали от простых молекул к модульным липидным транспортным системам [17–19]. Все компоненты таких систем должны проходить строгую оценку и отбор с точки зрения эффективности доставки НК, а сами системы должны быть нацелены на специфические органы и ткани.

2. Модульные липидные транспортные системы

Модульная липидная транспортная система (МЛТС) для доставки НК представляет собой самособирающийся контейнер, построенный из различных не связанных ковалентно липофильных модулей и запрограммированный на выполнение определенных функций: связывание и защиту НК, нацеленность на клетки-мишени, эффективное высвобождение НК из эндосом и транспорт в ядро [17, 18]. Такие МЛТС удачно описывает концепция ABCD-наночастиц [18]. Ядро АВ представляет собой комплекс НК с КЛ, покрытый защитным слоем С, который обеспечивает целостность частицы в биологических жидкостях, делая ее «невидимой» для белков сыворотки крови. Слой D обеспечивает активный направленный транспорт НК к целевым клеткам. Таким образом, чтобы система работала как эффективный переносчик, в ее состав должны входить [17–19]:

- связывающий модуль – катионный амфифил – для электростатического связывания НК и предотвращения ее деградации под действием нуклеаз;
- биосовместимый стабилизирующий модуль – для снижения степени взаимодействия с молекулами-дезактиваторами (альбумин, липопроотеиды низкой плотности, макроглобулины, гепарин) и увеличения времени циркуляции НК в организме;
- адресный модуль – для направленного транспорта НК и более эффективной интернализации внутрь клетки-мишени;
- дополнительные функциональные модули, помогающие основным модулям осуществлять свои функции – мембран-пронизывающие пептиды, эндосомолитические пептиды, стимул-чувствительные элементы и т.д.

Первым модулем системы доставки, который определяет ее эффективность, является КА. Структура КА представляет собой комбинацию двух основных доменов – гидрофобного и гидрофильного (катионного), соединенных спейсерной группой с помощью химической связи (линкера) определенного типа. Каждый из доменов вносит свой вклад

в активность молекулы КА и определяет ее поведение в организме. Гидрофобный домен участвует в формировании упорядоченных липидных структур, катионный – связывает молекулы НК, а спейсерная группа обеспечивает подвижность катионного и гидрофобного доменов в пространстве. Большое значение имеет линкерная группа, так как ее устойчивость определяет токсичность молекулы амфифила в биологических системах [20, 21]. На сегодняшний день синтезирован большой набор КА [21, 22], однако исследования в этом направлении постоянно развиваются. КА могут быть классифицированы на различные подгруппы согласно их основным структурным элементам: 1) монокатионные алифатические амфифилы, характеризующиеся наличием одного единственного заряженного атома азота в составе полярной головки; 2) поликатионные алифатические амфифилы, чей катионный домен содержит несколько заряженных атомов азота; 3) катионные производные холестерина и других стероидов; 4) симметричные гемини-амфифилы, содержащие в своей структуре два гидрофобных домена. Несмотря на определенные успехи в конструировании КА, уровень трансфекции, необходимый для практического использования, еще не достигнут, что связано как с недостатком данных по взаимосвязи «структура–активность», так и с необходимостью детального выяснения механизмов преодоления биологических барьеров на пути липоплексов. Некоторые закономерности влияния структуры КА на доставку НК описаны в обзорах [6, 10, 12, 13, 20, 21, 23].

Катионные липосомы конструируют из КА и липида-хелпера. Липид-хелпер оказывает важное влияние на строение и свойства липоплексов, улучшая эффективность доставки НК. Так, было показано, что липосомы, состоящие из КА и цвиттер-ионного фосфолипида DOPE (1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин), приводят к более эффективной доставке ДНК, чем липосомы на основе только КА [24–26]. Этот факт объясняется способностью DOPE к формированию инвертированной гексагональной липидной фазы, что вызывает слияние или дестабилизацию мембран, в частности, мембран эндосом, улучшая высвобождение НК [27, 28]. Помимо DOPE в качестве липида-хелпера может использоваться холестерин, который приводит к образованию «жестких» липосом, более перспективных в исследованиях *in vivo* [29–31].

Вторым модульным компонентом, способным защищать МЛТС от инактивации в биологических жидкостях, являются липофильные производные полиэтиленгликоля (ПЭГ). ПЭГ создает стерический барьер вокруг липоплексов, тем самым предотвращая взаимодействие с компонентами крови и захват липоплексов клетками ретикуло-эндотелиальной системы [32]. Существуют три основных подхода к

созданию транспортных систем, содержащих ПЭГ. В первом подходе липофильное производное ПЭГ вводится в состав КЛ до образования комплексов с НК, во втором – встраивается в уже сформированные липоплексы. В третьем подходе ПЭГ, снабженный реакционноспособной группой, взаимодействует с функциональными группами, расположенными на внешней поверхности липосом. Было показано, что только ПЭГ с молекулярным весом от 2000 Да способен адекватно осуществлять стерическую стабилизацию липоплексов [33]. Однако, несмотря на свои защитные функции, молекулы ПЭГ могут негативно влиять на эффективность доставки НК, затрудняя их высвобождение из эндосом [34, 35]. Поэтому при конструировании ПЭГ-содержащих МЛТС необходимо обеспечивать баланс между эффективной стерической стабилизацией и эффективностью трансфекции.

Третьим модулем, который может существенно улучшить эффективность транспорта НК, являются липоконъюгаты с адресными лигандами, которые способны с высокой селективностью связываться с поверхностными рецепторами клеток-мишеней. Для достижения максимальной специфичности поверхностный рецептор должен более активно экспрессироваться в целевых клетках по сравнению с другими клетками организма. Связывание лиганда с узнающими его рецепторами способствует эффективному проникновению переносимого «груза» в цитоплазму за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза [36]. Нацеливающие лиганды могут быть как низкомолекулярными соединениями (например, галактоза, фолиевая кислота, липопротеины низкой плотности, небольшие пептиды), так и белками (например, трансферрин и моноклональные антитела) (таблица) [37].

Лиганды, используемые для адресной доставки НК

Рецептор	Клетки	Лиганд
Асиалогликопротеиновые рецепторы	Гепатоциты	Асиалооросукоид, галактоза, лактоза, <i>N</i> -ацетилгалактозамин
Рецептор маннозы	Макрофаги, дендритные клетки	Манноза
Рецептор лактозы	Эпителиальные клетки легких	Лактоза
Иммуноглобулиновый рецептор		F _{ab} -фрагмент IgG
Рецептор тирозинкиназы HER-2	Опухолевые клетки, эпителиальные, мезенхимальные и нейрональные клетки	Анти-HER-2
Фолатный рецептор	Опухолевые клетки, повышено экспрессирующие рецепторы	Фолиевая кислота
Интегриновые рецепторы		RGD- и NRG-пептиды и их миметики
Рецепторы трансферрина		Трансферрин
Рецепторы эпидермального фактора роста (EGF)	Клетки NR6 (фибробласты), клетки карциномы	EGF, моноклональные антитела

Использование в качестве лигандов углеводов и их конъюгатов с другими биологически активными молекулами получило название *гликонацеливание*. Эта стратегия широко развивается в настоящее время для направленной доставки НК и других классов терапевтических молекул. В основе стратегии лежит высокоспецифичное взаимодействие углеводов с лектинами – углеводсвязывающими белками, находящимися на поверхности клеток млекопитающих (в том числе, и на злокачественных клетках).

Лектины способны обратимо и избирательно связывать разнообразные углеводы как в индивидуальном виде, так и в составе гликоконъюгатов, не нарушая ковалентной структуры последних. Лектин-углеводные взаимодействия имеют огромное значение в биологии [38]. Доменные центры лектинов выступают в качестве чувствительнейших биосенсоров, детектирующих определенные углеводные последовательности в олигосахаридах [39].

Лектины позвоночных подразделяются на множество семейств. Из восьми наиболее хорошо изу-

ченных групп четыре включают лектины, которые располагаются внутри клетки (семейство калнексина, лектины М-типа, L-типа и Р-типа) и участвуют в продвижении, сортировке и нацеливании гликопротеинов. Остальные лектины (галектины и лектины С- и R-типов) либо секретируются во внеклеточный матрикс и в биологические жидкости организма, либо локализуются в плазматической мембране, где выполняют ряд функций, включая клеточную адгезию, сигнализацию и распознавание патогенов [40]. В интересах направленного транспорта НК нас будут интересовать лектины, расположенные на клеточной мембране и опосредующие процесс эндоцитоза.

3. Направленная доставка нуклеиновых кислот в клетки печени

Одним из важнейших органов, для которого разрабатываются адресные МЛТС, является печень. Главная функция печени – поддержание метаболического гомеостаза организма, который включает

эффективное накопление аминокислот, углеводов, липидов и витаминов, их последующее хранение, метаболическое обращение, контроль содержания в крови и желчи. Кроме того, печень секретирует в кровь белки – факторы свертывания крови VIII и IX, недостаток которых вызывает гемофилии А или В, соответственно. Генетические нарушения клеток этого органа приводят к таким заболеваниям, как уже упомянутая гемофилия, гиперлипопротеидемия (недостаток рецепторов липопротеинов низкой плотности), гиперхолестеринемия, гиперурикемия, болезнь Коновалова-Вильсона, рак печени [41].

Печень на 60–70% состоит из гепатоцитов (клеток паренхимы), которые играют центральную роль в углеводном и жировом обмене всего организма. На поверхности гепатоцитов располагаются асиалогликопротеиновые рецепторы (АСГПр), которые относятся к лектинам С-типа млекопитающих. Эти рецепторы играют важную роль в удалении из кровотока десиалированных белков, распознавая терминальные остатки D-галактозы и N-ацетил-D-галактозамина [42, 43]. Среди полисахаридных адресных лигандов, нацеленных на АСГПр, наиболее часто используют так называемые «асиалогликопротеины» (АГП), которые получают из ряда гликопротеинов после их ферментативной или химической модификации, приводящей к появлению терминальных галактозильных групп [44, 45]. Позднее было показано, что лигандами для АСГПр могут быть не только гликопротеины, но и другие молекулы, содержащие остатки D-галактозы. Например, комплексы ДНК с лактозилированным поли-L-лизинном оказались эффективными при трансфекции клеток гепатокарциномы НерG2 [46].

Эндотелиальные синусоиды печени (ЭСП) составляют 20% от общего числа клеток печени. Они образуют селективный барьер между кровью и гепатоцитами и выполняют защитные функции, очищая кровь от вредоносных составляющих. Механизмы очистки включают рецептор-опосредованный эндоцитоз, транцитоз и фагоцитоз. Многие белки и другие молекулы проникают внутрь ЭСП посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, благодаря гиалуроновым, проколлагеновым, фибронектиновым рецепторам. На поверхности ЭСП также присутствуют Ca^{2+} -зависимые рецепторы, распознающие терминальные остатки D-маннозы и N-ацетил-D-глюкозамина в составе гликопротеинов.

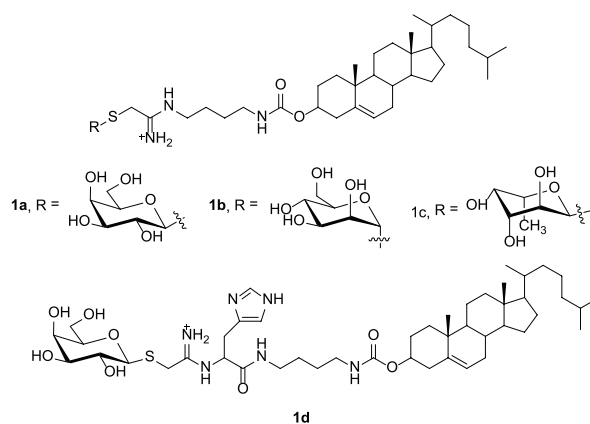
Купферовские клетки (КК) являются тканевыми макрофагами и относятся к клеткам ретикуло-эндотелиальной системы. Основной функцией КК является выведение из кровотока микроорганизмов, липополисахаридов и опухолевых клеток. Они составляют 15% от общего числа клеток печени и располагаются предпочтительно в перипортальных

областях. Подобно ЭСП, купферовские клетки имеют на своей поверхности фибронектиновый, маннозный, CD14-рецепторы, а также рецепторы класса AI и AII. Кроме маннозного рецептора, КК обладают еще двумя углеводными рецепторами, распознающими терминальные остатки D-галактозы и L-фукозы [47].

В настоящее время для доставки НК разрабатываются два конкурирующих подхода к конструированию адресных МЛТС. В первом подходе основным компонентом МЛТС является углеводсодержащий КА, который одновременно компактизует НК и осуществляет функцию нацеливания на специфические клетки, благодаря наличию в его структуре адресного лиганда. В другом подходе эти функции выполняют различные не связанные друг с другом ковалентно модули: КА и липоконъюгат с нацеливающим лигандом.

3.1. Катионные неогликоконъюгаты для модульных липидных систем доставки нуклеиновых кислот

Для доставки НК был синтезирован неогликоконъюгат **1a**, который представляет собой бифункциональную молекулу, содержащую остаток D-галактозы для взаимодействия с АСГПр гепатоцитов и иминогруппу для связывания НК [48].

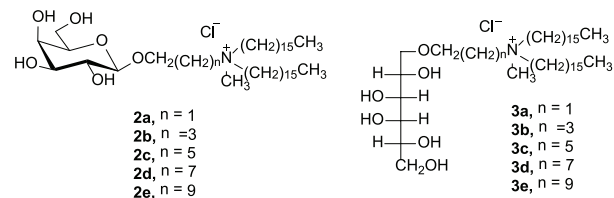


Адресные катионные липосомы, содержащие гликолипид **1a**, были нетоксичными и эффективно переносили плазмидную ДНК в клетки НерG2, экспрессирующие АСГПр, причем их трансфицирующая активность превысила активность обычных липосом [49]. Эксперименты по конкурентному ингибированию в присутствии свободной D-галактозы показали, что доставка ДНК в клетки осуществлялась посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. Липосомы, содержащие неогликоконъюгат **1d**, способствовали лучшей трансфекции клеток НерG2, чем липосомы на основе соединения **1a**, благодаря наличию pH-чувствительного остатка L-гистидина [50]. Катионные неогликолипиды **1b,c**, содержащие

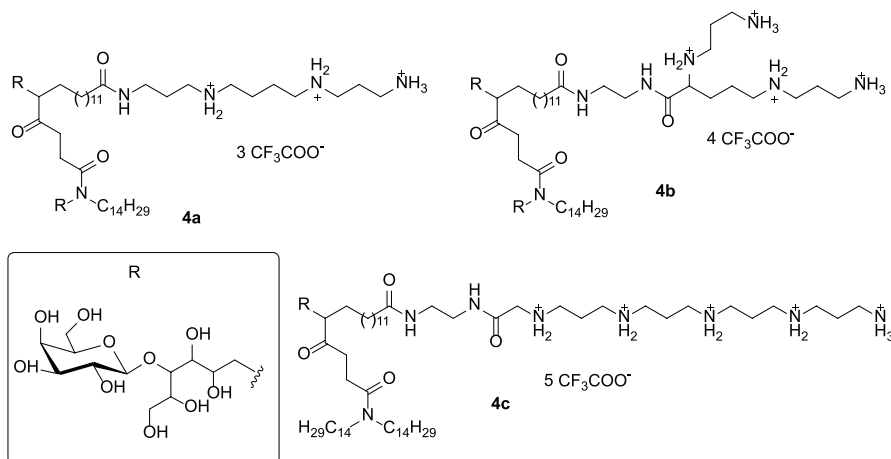
остатки D-маннозы или L-фукозы [51–53], продемонстрировали высокий уровень трансфекции клеток печени *in vivo* [53]. В первые часы после внутривенного введения липоплексы проникали в легкие и селезенку, видимо, реагируя с рецепторами макрофагов этих тканей, а в дальнейшем накапливались в печени, преимущественно в непаренхимных клетках. При введении липоплексов в портальную вену, уже через 6 ч накопление наблюдалось исключительно в клетках печени. Использование неогликоконъюгата **1c** обеспечивало эффективный транспорт антисмысловых олигонуклеотидов в КК. Уровень трансфекции этих клеток адресными фукозилированными липосомами был гораздо выше, чем маннозилированными липосомами, что делает L-фукозу более предпочтительным лигандом для трансфекции макрофагов [54].

Для изучения влияния формы углевода (циклическая и ациклическая) на доставку НК были синтезированы две серии катионных гликолипидов **2a–e** и **3a–e**, в которых помимо формы углевода варьировалась также длина спейсера между остатком углевода и катионной головкой [55]. Среди катионных неогликолипидов с циклическим галактозильным остатком наиболее эффективным оказалось соединение **2c** с гексаметиленовым спейсером. Среди гликолипидов

3a–e только соединение **3a** с длиной спейсера в два метиленовых звена проявило высокую трансфицирующую активность. Данные неогликолипиды способствовали адресной доставке НК *in vivo*, которая ингибировалась внутривенным введением асиалофетуина.

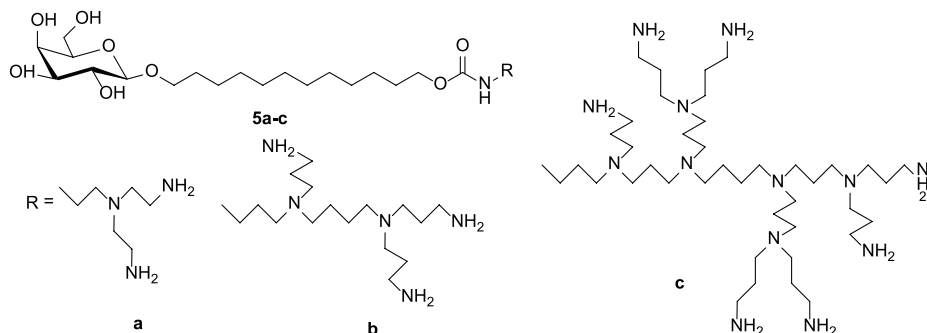


Адресные липосомы на основе поликатионных углеводсодержащих конъюгатов **4a–c** и DOPE формируют с ДНК стабильные коллоидные частицы, которые способны проникать в клетки HepG2 по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза, задействуя АСГПр [56]. Однако такое специфическое проникновение возможно лишь для комплексов, сформированных липосомами и ДНК при соотношении N/P = 1:1. В случае, когда комплексы формировались при большом избытке КЛ, их проникновение в клетки носило неспецифический характер адсорбционного эндоцитоза.

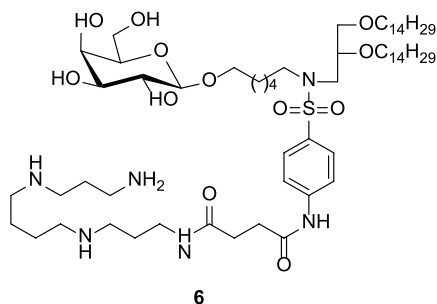


Для увеличения степени связывания с ДНК были синтезированы поликатионные неогликоконъюгаты **5a–c**, содержащие от 3 до 13 аминогрупп [57]. Соединения **5a,b** плохо образовывали комплексы с ДНК, что приводило к низкой эффективности трансфекции клеток. Амфифил **5c**, содержащий семь первичных

аминогрупп, эффективно связывал и доставлял ДНК в клетки BL-6. Основываясь на полученных результатах, для эффективной адресной доставки НК была предложена стратегия синтеза бифункциональных соединений, способных к связыванию и упаковке ДНК и обладающих сродством к гепатоцитам [57].



Был разработан синтез гликолипида **6**, в котором поликатионная группа, представленная остатком спермина, посредством промежуточных линкеров вынесена в периферическую область липидной молекулы [58]. Данный гликоконъюгат способствовал эффективному переносу в эукариотические клетки олигодезоксирибонуклеотидов, плазмидной ДНК, а также малой интерферирующей РНК. Однако его активность значительно снижалась в присутствии сыворотки крови.



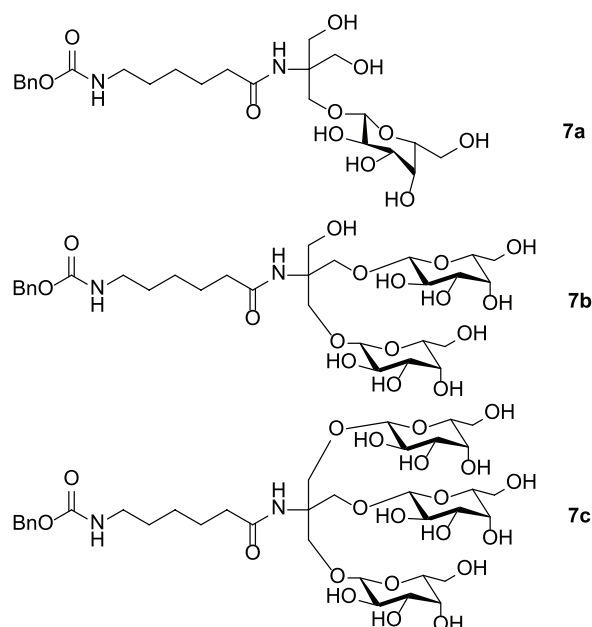
3.2. Эффект мультивалентности в гликонацеливании

Низкое сродство адресных МЛТС к рецепторам является одним из главных препятствий для эффективного нацеливания на клетки-мишени с помощью неогликоконъюгатов. Аффинность – наиболее важный критерий, который необходимо учитывать при конструировании адресных систем доставки, которые должны конкурировать за связывание с рецептором с другими эндогенными лигандами. Моновалентные лиганды, такие как D-галактоза, лактоза и моновалентные гликозиды, взаимодействуют с мультимерными рецепторами клеток печени с миллимолярной константой связывания [59], что часто бывает недостаточно для успешного нацеливания МЛТС в физиологических условиях.

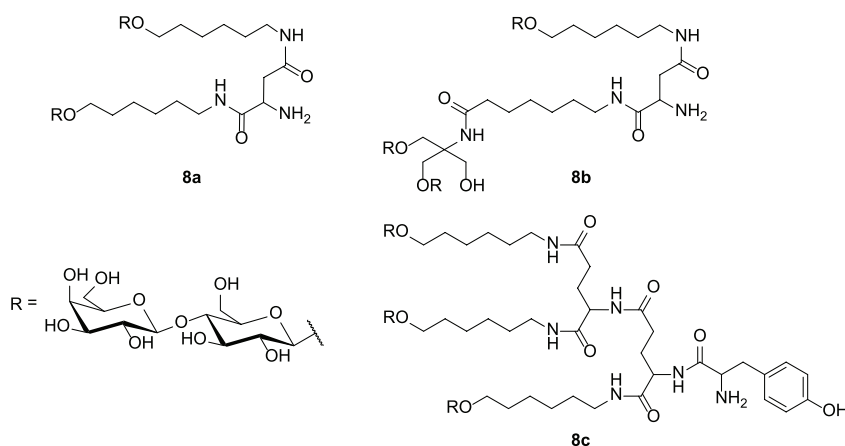
В биосистемах увеличение силы и специфичности связывания обеспечивается мультивалентными взаимодействиями между лигандом и рецептором. На настоящий момент созданы мультивалентные лиганды, которые обладают более высокой аффинностью к рецепторам по сравнению с соответствующими мономерными лигандами. Для создания мультивалентных неогликоконъюгатов используются разнообразные матрицы, к которым через линкеры различного типа (амидный, сложноэфирный, карбамильный) присоединяются углеводные остатки на гибких спейсерах [60]. При этом для связывания с рецептором важен удачный выбор матрицы и спейсеров, так как данные структурные элементы влияют на размер молекулы и пространственное расположение углеводных звеньев. В качестве матриц используют небольшие молекулы, содержащие несколько функ-

циональных групп, например, трис(2-аминоэтил)амин, трис(гидроксиметил)аминометан, 1,3-диаминопропанол, аминокислоты, олигопептиды, углеводы, а также производные пентаэритрита, гетероциклических оснований и бензойной кислоты.

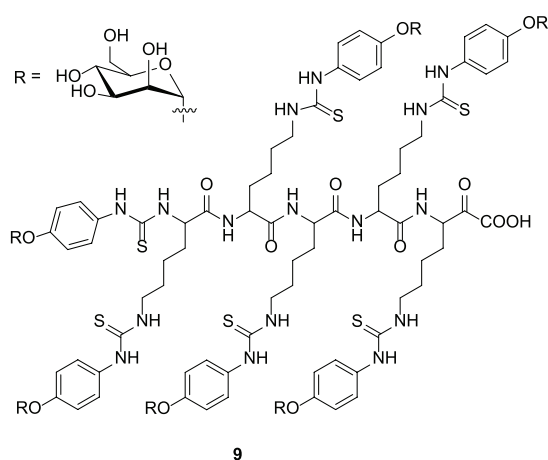
Первые синтетические олиговалентные гликоконъюгаты **7a–c**, которые проявили повышенное сродство к АСГПР, были получены на основе аминометана [61]. Для соединений **7a–c** при увеличении количества углеводных лигандов от 1 до 3 наблюдалось логарифмическое повышение их аффинности к АСГПР гепатоцитов, что получило название «кластерный эффект» [61, 62]. При дальнейшем изучении структуры АСГПР гепатоцитов было обнаружено, что наилучшим образом он узнает «трехантенный» конъюгат, в котором углеводные остатки расположены в углах треугольника со сторонами 15, 22 и 25 Å [63, 64].



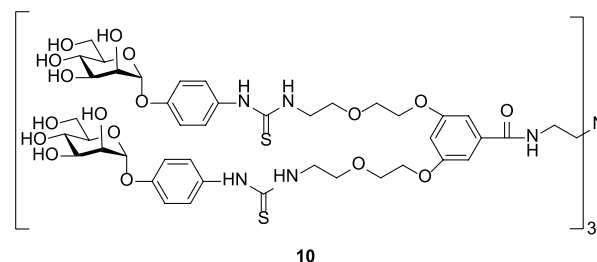
Для создания мультивалентных соединений удобными молекулами являются дикарбоновые аминокислоты. Была синтезирована серия неогликоконъюгатов, содержащих от 1 до 6 остатков D-галактозы [65], и исследована способность данных соединений конкурентно ингибировать связывание ¹²⁵I-асиалооросомукоида с лектином в растворе и на поверхности гепатоцитов. В соединениях **8a–c** с гибкими спейсерными группами обеспечивалось оптимальное расстояние между остатками D-галактозы в пространстве, и они ингибировали связывание при концентрациях 0.3, 0.05 и 0.045 мкМ, соответственно. Дальнейшее увеличение количества углеводных лигандов (4 или 6 остатков галактозы) не приводило к заметному увеличению сродства конъюгатов к рецептору.



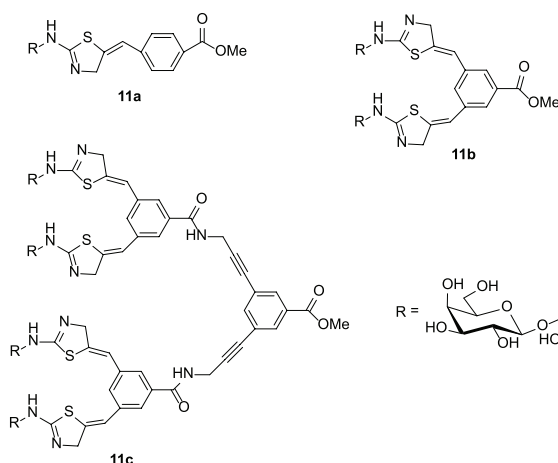
При создании разветвленной структуры неогликоконъюгатов матрицей может служить олигопептид, на который прикрепляют адресные лиганды. Кластерный маннозид **9**, полученный на основе олиго-L-лизина, связывался с маннозоузнающим рецептором в наномолярных концентрациях [66]. Аналогичную компоновку имели маннозилсодержащие гликопептиды, синтезированные для изучения связывания с бактериальным лектином FimH [67]. В качестве матрицы выступал пентапептид на основе L-лизина, глицина и L-аланина, к которому присоединяли различное количество остатков D-маннозы. Наиболее эффективными оказались соединения с двумя или тремя углеводными остатками.



Для создания разветвленной структуры соединений **10** и **11a–c** в качестве матриц были использованы производные бензойной кислоты. Так, на основе 3,5-дигидроксibenзойной кислоты был синтезирован сферический дендример **10** с шестью терминальными остатками D-маннозы, который эффективно связывался с растительным лектином – конканавалином А [68]. Подобный подход к конструированию мультивалентных неогликоконъюгатов можно применить и для создания гликолипидов, выполняющих адресные функции в составе систем доставки НК.

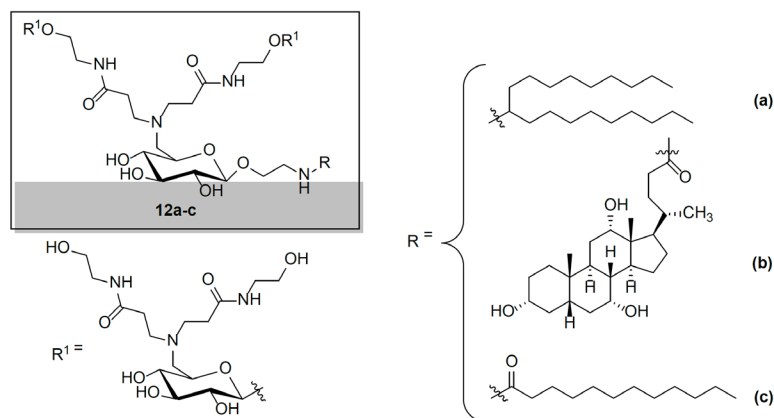


Влияние мультивалентности на связывание с галектинами 1, 3 и 5 было исследовано для неогликоконъюгатов **11a–c** [69]. Аффинность связывания соединения **11c** с галектином-3 превосходила в 4300 раз аффинность природного лиганда – асиалофетуина, и в 21 раз – моногалактозида **11a**, что свидетельствовало о наличии кластерного эффекта.



Используя в качестве матрицы остаток D-глюкозы, были синтезированы липофильные неогликоконъюгаты **12a–c** [70], которые могут быть при необходимости дополнительно модифицированы по свободным гидроксильным группам. Синтетический подход к получению гликоконъюгатов **12a–c** основан на дизайне так называемых «смешанных глико-

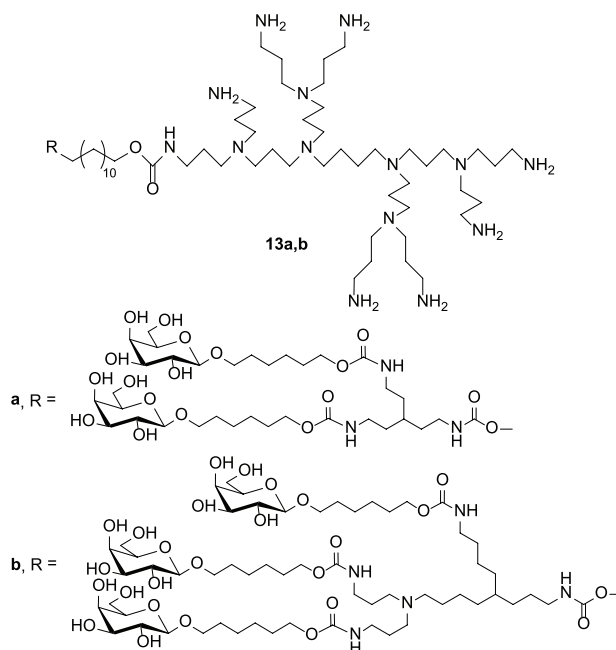
кластеров» [71]. В качестве гидрофобных доменов использовались остатки лауриновой и хлестерной кислоты, а также нонадекан-10-ола. Полученные соединения за счет своей амфифильной природы могут быть использованы в качестве адресных лигандов в составе систем доставки НК.



3.3. Мультивалентные неогликоконъюгаты для модульных липидных систем доставки нуклеиновых кислот

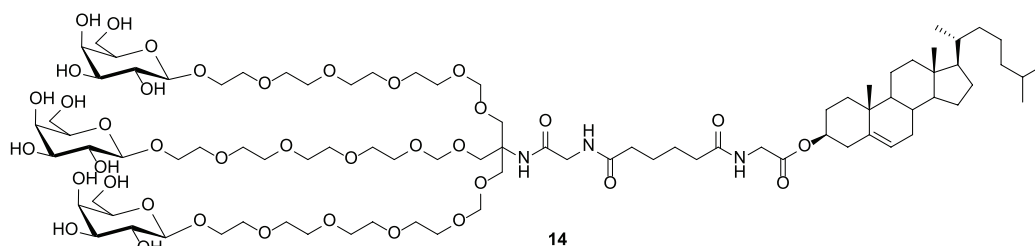
Для достижения кластерного эффекта при связывании КЛ с АСПР, были получены соединения **13a,b** с различным количеством остатков D-галакто-

зы и исследована их способность доставлять ДНК в клетки BL-6 или HepG2, экспрессирующие АСПР [57]. Результаты показали, что эффективность трансфекции клеток BL-6 не зависела от количества углеводных остатков, в то время как для клеток HepG2 наблюдали увеличение эффективности доставки при увеличении количества адресных лигандов.



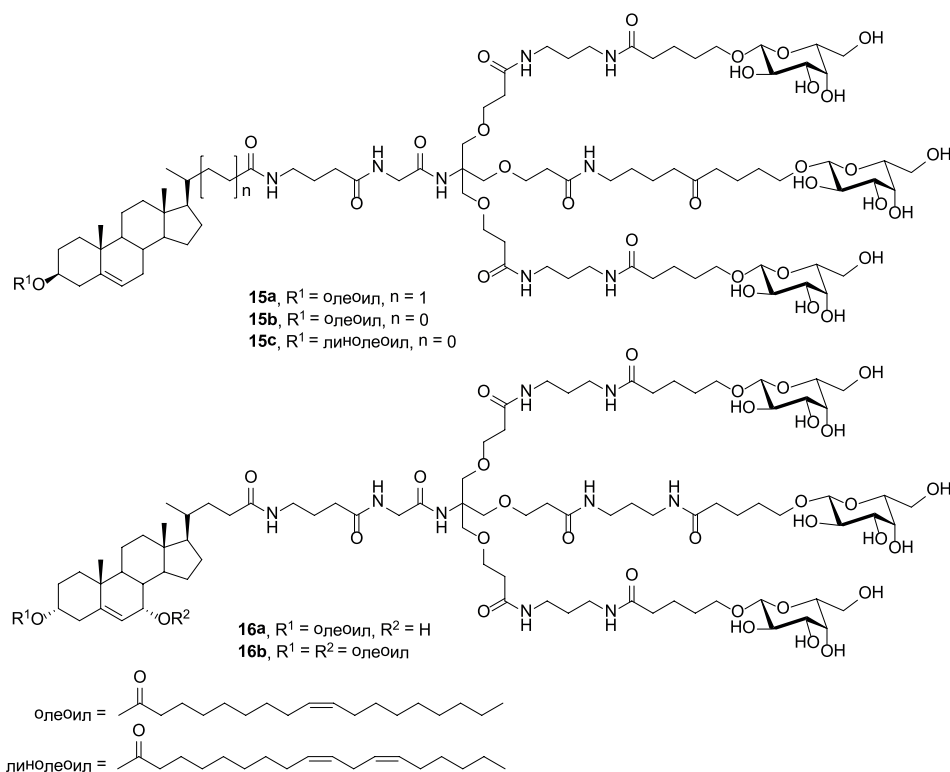
Структурная вариабельность углеводов нейтральных амфифилов для нацеливания липосом на АСПР достигается также за счет изменения длины и природы спейсерных групп. В структуре неогликолипида **14** галактозные остатки присоединены к матрице гибкими олигоэтиленгликолевыми спейсерами длиной 20 Å [72]. Данный

неогликолипид эффективно связывался с АСПР, однако его гидрофильность не позволяла ему надежно закрепиться в липидном бислое липосом. Кроме того, кислотолabile ацетальные линкеры не обеспечивают должную химическую стабильность, что ограничивало его применение для адресной доставки НК в гепатоциты.



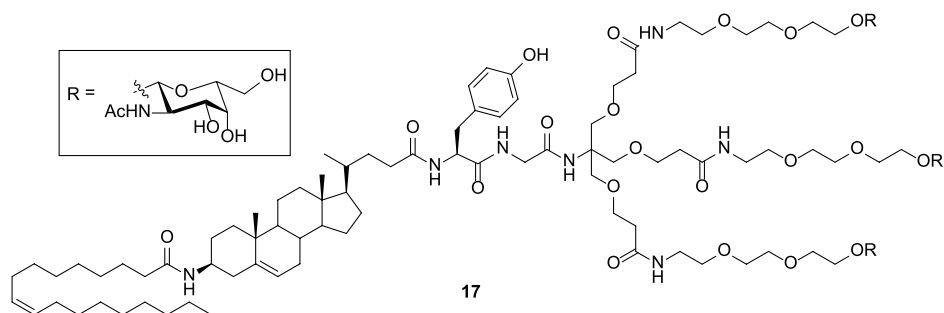
Для устранения вышеперечисленных недостатков были синтезированы соединения **15a–с** и **16a,b**, содержащие дополнительные остатки жирных кислот

для лучшего встраивания неогликоконъюгата в липидный бислой, а также простые эфирные линкеры для увеличения химической стабильности [73].



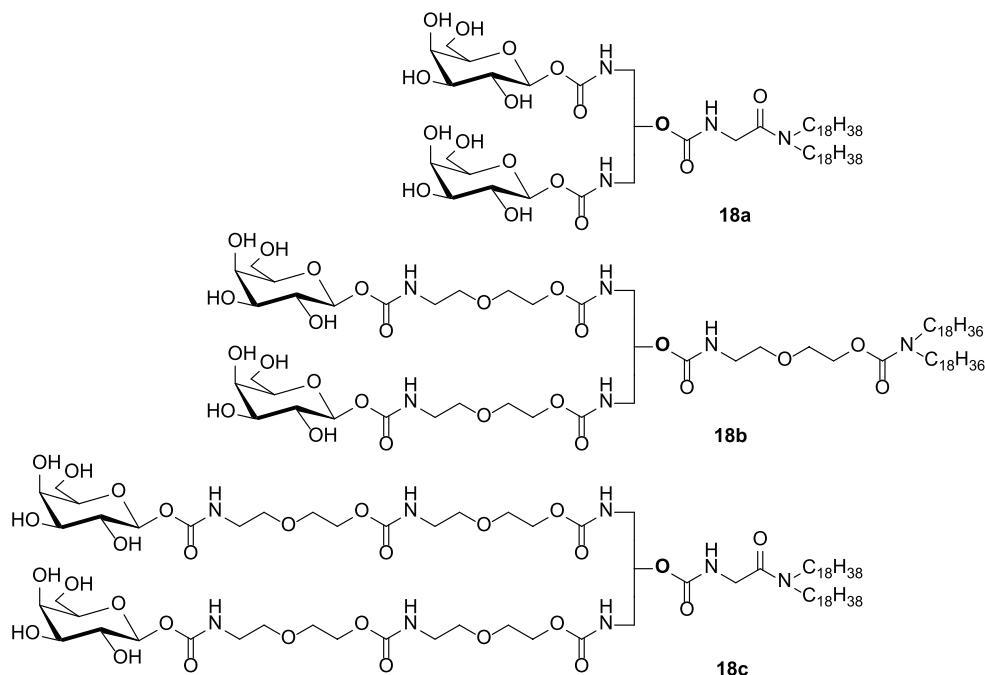
В ходе исследований было выявлено, что гликолипид **16b** с двумя жирнокислотными остатками не способен встраиваться в липосомы, а гликолипид **15c** с остатком линолевой кислоты подвергается быстрому окислению, поэтому исследования *in vivo* проводили с соединениями **15a,b** и **16a**. Гепатоциты захватывали и поглощали более 83% адресных липосом, содержащих 5 или 10% неогликолипидов **15a,b** и **16a**. Увеличение количества гликолипидов в липосомах

до 50% изменяло их клеточную специфичность и приводило к накоплению в купферовских клетках. Дальнейшие исследования привели к созданию гликолипида **17** [74], в котором остатки D-галактозы были заменены на остатки N-ацетил-D-галактозамина, обладающего большим сродством к АСГПр. Эта замена привела к 50-тикратному увеличению аффинности адресных липосом к АСГПр (для соединения **17** $K_{св.} = 2.1 \pm 0.3$ нМ, для соединения **15b** $K_{св.} = 100 \pm 1$ нМ).



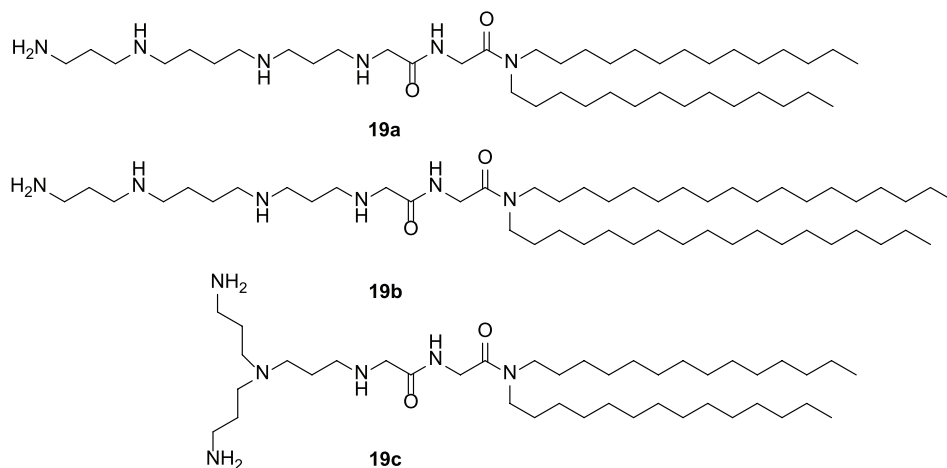
Для изучения транспорта НК были получены МЛТС, содержащие неогликолипиды **18a–c** в качестве адресного модуля. Эти соединения были син-

тезированы на основе 1,3-диаминопропан-2-ола и содержали в качестве гидрофобного домена октадецильные заместители [75].



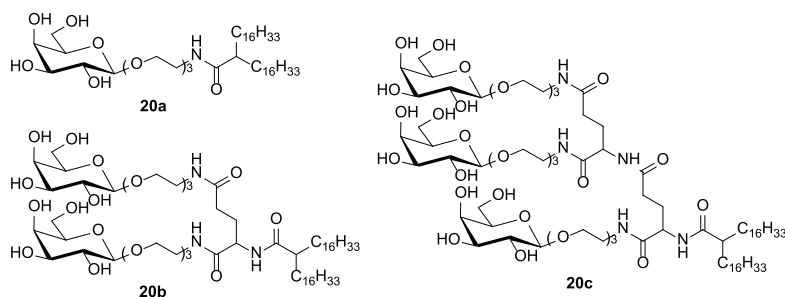
Функцию связывающего модуля в МЛТС выполняли КА **19a–c** в сочетании с липидами-хелперами DOPE или яичным фосфатидилхолином. Было обнаружено, что агглютинации в присутствии растительного лектина – рицина – подвергаются только липосомы, в состав которых входит неогликолипид **18b**, а наиболее подходящим связывающим модулем был амфифил **19c**. Доставка плазмидной ДНК *in vitro* с помощью адресных МЛТС показала, что липоплек-

сы активно переносили НК как в клетки HepG2, так и в клетки HeLa, лишенные АСППр. Таким образом, эти адресные МЛТС не обеспечивали нацеливание на гепатоциты, что связано с избыточным положительным зарядом липоплексов, который приводит к неспецифическому электростатическому взаимодействию комплексов с отрицательно заряженной клеточной мембраной, нивелирующему вклад лиганд-рецепторных взаимодействий.



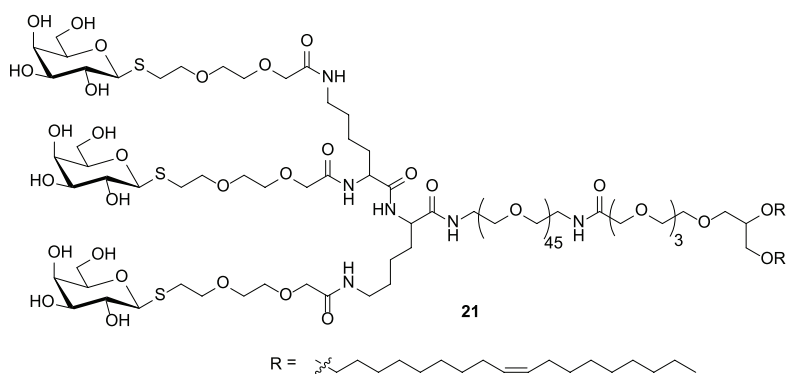
Адресные липосомы, состоящие из дипальмитилфосфатидилхолина, холестерина, дицетилфосфата и неогликолипидов **20a–c**, подвергались агглютинации в присутствии растительного лектина RCA₁₂₀ [75]. Эффективность данного процесса зависела от структуры неогалаколипидов: для ди- и трехвалентных производных полная агглютинация наблюдалась

при меньшем количестве неогликолипида в составе липосом. При внутривенном введении липосом крысам не было выявлено никаких различий в накоплении липосом в печени, а решающую роль в обеспечении направленной доставки в гепатоциты играло содержание гликолипидов **20a–c** в липосомах.



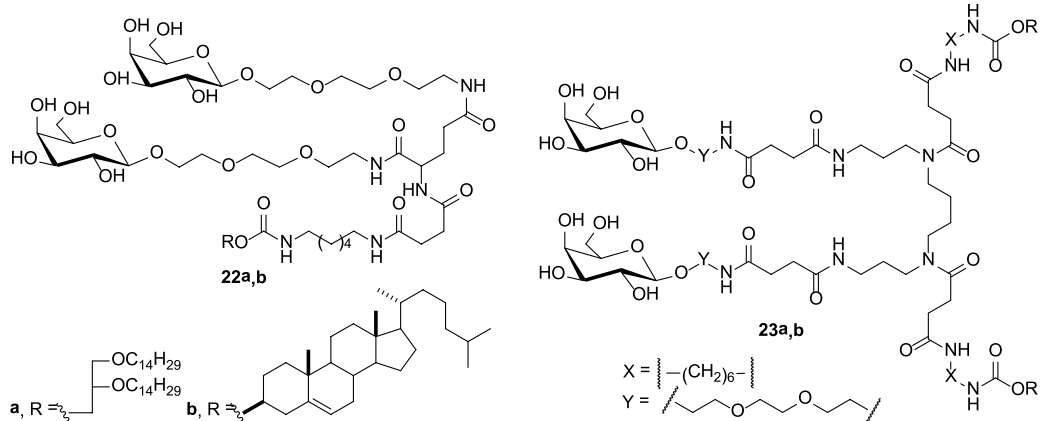
Известно, что КЛ неэффективно доставляют НК *in vivo*, главным образом из-за их взаимодействия с белками сыворотки крови, что приводит к их быстрому выведению из кровотока клетками ретикуло-эндотелиальной системы. Чтобы избежать такого нежелательного взаимодействия, поверхность катионных липосом модифицируют гидрофильными молекулами ПЭГ (стабилизирующий модуль). Однако наличие подвижных остатков ПЭГ может помешать рецептору распознать

специфический лиганд. Присоединение лиганда непосредственно к дистальному концу ПЭГ помогает избежать подобных проблем [77]. Включение в состав липоплексов галактозосодержащего ПЭГ-модифицированного конъюгата **21** стабилизирует липоплексы и частично «маскирует» их положительный заряд. Однако, проникнув в клетки, комплексы были неспособны высвободиться из эндосомального окружения и подвергались полной деградации в лизосомах.



Новые бивалентные неогликоконъюгаты на основе L-глутаминовой кислоты (**22a,b**) или спермина (**23a,b**) были синтезированы для создания адресных МЛТС, способных доставлять НК в гепатоциты [78, 79]. Адресные липосомы подвергались агглютинации в присутствии углеводсвязывающего лектина

RCA₁₂₀, а эффективность этого процесса зависела от количественного содержания конъюгатов в липосомах. Было установлено, что адресные липосомы, содержащие соединение **23a**, специфично доставляли флуоресцентно-меченый олигодезоксирибонуклеотид в клетки HepG2 [79].



Помимо D-галактозы, для нацеливания на АСТГР гепатоцитов можно использовать лактозу, которая содержит терминальный галактозильный остаток, а глюкоза выступает дополнительным спейсером между лигандом и гидрофобным доменом неогликоконъюгата [46, 80, 81].

4. Направленная доставка нуклеиновых кислот в дендритные клетки

Дендритные клетки (ДК) – гетерогенная популяция антигенпредставляющих клеток, которые играют

важную роль в развитии адаптивного иммунного ответа к различным патогенам и опухолевым клеткам. ДК располагаются в нелимфоидных тканях в незрелом состоянии, в котором способны легко захватить антиген (любая чужеродная молекула, которая индуцирует выработку специфических антител), процессировать его и представить на своей клеточной поверхности [82]. Переход ДК из незрелого во взрослое состояние сопровождается перераспределением молекул главного комплекса гистосовместимости из внутриклеточных везикул к клеточной поверхности, образованием дендритов и секрецией различных цитокинов и хемокинов. В области лимфатических узлов зрелая ДК взаимодействуют с нативными Т-лимфоцитами, которые экспрессируют специфические рецепторы, узнающие антигены на поверхности ДК. Активированные Т-лимфоциты покидают лимфоидные ткани и перемещаются обратно к воспаленным тканям, где они узнают клетки, инфицированные вирусом, или опухолевые клетки, и уничтожают их без вреда для нормальных клеток [83].

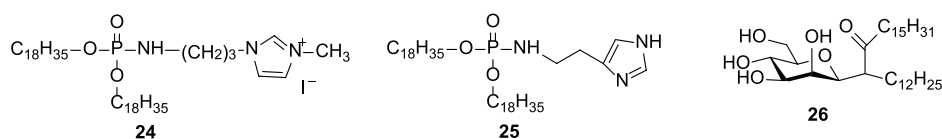
Поглощение, процессирование и презентация антигена дендритными клетками является критическим фактором при создании вакцин на основе ДК и иммунотерапии инфекционных заболеваний и рака. Большинство противоопухолевых вакцин представляют собой лизаты аутологических и аллогенных опухолевых клеток, введенные внутрь опухоли в виде совместных инъекций с белками теплового шока и цитокинами. Также для целей иммунизации используются генетически модифицированные опухолевые клетки [84]. В попытке улучшения способности представлять опухолевые антигены, ДК трансформируют *in vitro* экзогенными РНК и ДНК [85], кодирующими опухолевые антигены, что позволяет увеличить эффективность вакцинации [86]. На сегодняшний день существует необходимость в разработке подходов, которые позволяют осуществить направленную

доставку плазмидной ДНК или мРНК, кодирующих опухолевые антигены, в ДК *in vivo*.

Дендритные клетки содержат на поверхности несколько типов высоко специализированных рецепторов, включая лектиновый рецептор С-типа и толл-подобные рецепторы. Лектиновые рецепторы лектина С-типа узнают, связывают и поглощают углеводсодержащие антигены [87], которые затем эффективно «обрабатываются» и представляются дендритными клетками для нативных Т-лимфоцитов, тем самым вызывая иммунный ответ. К семейству рецепторов данного типа относится рецептор D-маннозы, сверхэкспрессирующийся на поверхности незрелых ДК [88].

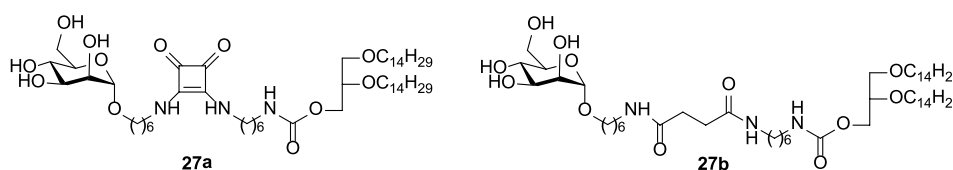
Для успешной доставки НК в незрелые ДК разрабатываются МЛТС, содержащие в своем составе неогликоконъюгаты с терминальным остатком D-маннозы. Так, направленная доставка плазмидной ДНК была проведена с помощью липосом на основе катионного неогликолипида, содержащего аминогруппу для связывания НК и остаток D-маннозы для связывания с рецептором на поверхности ДК [51]. Адресные маннозиллированные липосомы по эффективности превосходили обычные липосомы, а ингибирование доставки в присутствии D-маннана свидетельствовало о том, что липоплексы проникают в клетку с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза. При проведении ДНК-вакцинации *in vivo* происходила активация цитотоксичных Т-лимфоцитов, сопровождающаяся выработкой цитокинов и последующей гибелью клеток меланомы B16BL6.

Адресные МЛТС на основе катионного амфифила **24**, нейтрального амфифила **25** и неогликолипида **26**, содержащего остаток D-маннозы, способствовали доставке мРНК *in vivo*, приводящей к ингибированию роста клеток меланомы B16F10 [89], и позволило рассматривать данную терапевтическую систему как индуктор противоопухолевого иммунного ответа [90].



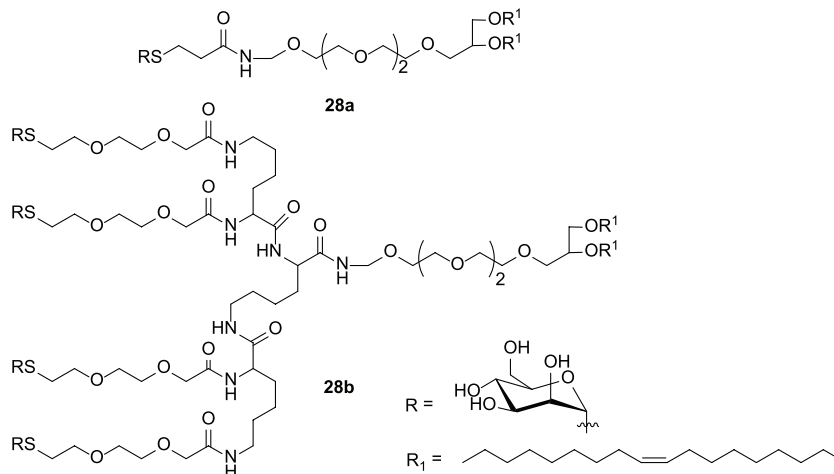
Для трансфекции ДК были получены адресные КЛ, содержащие неогликоконъюгаты **27a,b** с остатком D-маннозы, которые имели преимущество перед обычными липосомами при доставке плазмидной ДНК и мРНК в ДК [91]. Инъекция ДК, предварительно трансформированных комплексами, сформиро-

ванными адресными липосомами и мРНК клеток меланомы B16F10 вызвала шестикратное снижение количества метастазов в легких мышей. Кроме того, внутривенное введение комплексов индуцировало образование цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к клеткам меланомы B16F10.



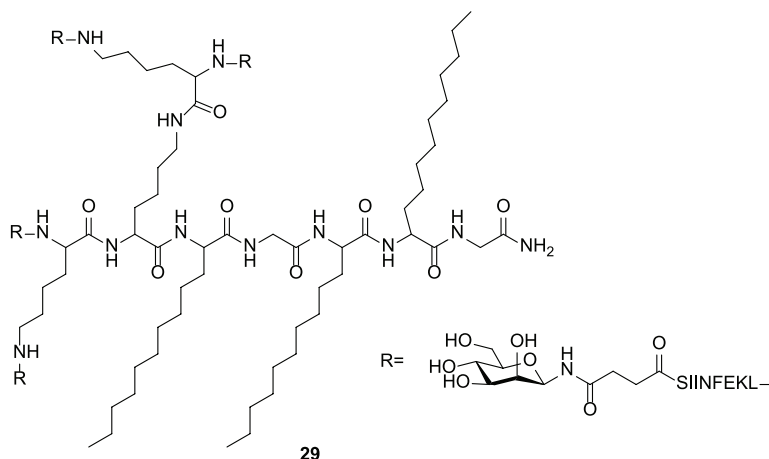
Мультивалентный нейтральный неогликоконъюгат **28b** был синтезирован для увеличения эффективности связывания липосом с маннозными рецепторами [92]. Исследование доступности остатков D-маннозы, экспонированных на поверхности липосом, для связывания с конканавалином А показало, что агглютинация липо-

сом с тетравалентным гликоконъюгатом **28b** была в 10 раз больше агглютинации липосом, содержащих моновалентный конъюгат **28a**, что свидетельствовало о наличии кластерного эффекта при взаимодействии лиганда с рецептором.



Помимо НК, в ДК можно доставлять антигены другой природы. Липосомы, состоящие из фосфатидилхолина и маннозилсодержащего липопептида **29**, были

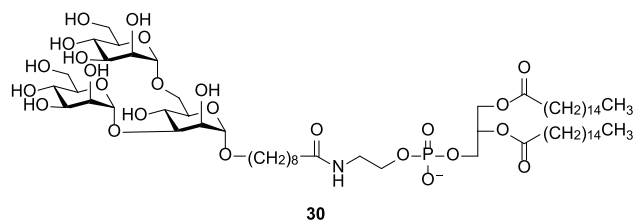
использованы для доставки *in vivo* эпитопов гликопротеина CD8, которая приводила к эффективному стимулированию CD8⁺-Т-клеточного ответа [93].



Липосомы с неогликоконъюгатом **30** поглощались ДК эффективнее, чем липосомы, не содержащие гликолипида. Доступность маннозильных остатков для взаимодействия с рецептором была подтверждена в экспериментах по агглютинации липосом в присутствии конканавалина А [94].

стимулируют молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса по сравнению с аналогами, не содержащими D-маннозу, а антиген, попавший в ДК через рецептор маннозы, в 100 раз лучше представлен Т-клеткам, чем антиген, проникший путем макропиноцитоза [95].

Для доставки антигенов в ДК также были предложены полимеры на основе ацетилированного декстрана. Модификация поверхности полимерных частиц D-маннозой привела к увеличению уровня представленных ДК антигенов белкам главного комплекса гистосовместимости I класса *in vitro* [96].



5. Заключение

Было также установлено, что маннозилированные пептиды и белки в 200–10000 раз эффективнее

К настоящему времени разработаны различные типы наноразмерных модульных липидных систем

доставки НК. Для обеспечения направленного терапевтического воздействия в состав МЛТС необходимо вводить липоконъюгат, содержащий в своей структуре адресный лиганд. Для лечения заболеваний печени в состав липосом включают соединения с остатком D-галактозы, N-ацетил-D-галактозамина или лактозы, а для создания нового поколения вакцин на основе дендритных клеток – неогликоконъюгаты с остатком D-маннозы.

Однако при решении проблемы адресной доставки НК необходимо также учитывать физико-химические параметры МЛТС и формируемых ими комплексов с НК. Наиболее важными параметрами являются размер и поверхностный потенциал комплексов, которые зависят как от соотношения компонентов, так и от состава МЛТС. В случае использования избытка МЛТС формируются комплексы с высоким положительным зарядом, которые проникают в клетку за счет неспецифического адсорбционного эндоцитоза. Для осуществления адресной доставки НК необходимо обеспечить превосходство рецептор-опосредованного эндоцитоза над адсорбционным эндоцитозом, которое может быть достигнуто только за счет уменьшения положительного заряда липоплексов. Такое уменьшение должно быть разумным, поскольку нейтральные комплексы склонны к быстрой агрегации, а отрицательно заряженные – не обладают должной эффективностью доставки НК. Поэтому, наряду с поиском оптимальных структур адресных неогликоконъюгатов, одной из дополнительных задач становится определение соотношения компонентов липоплекса, обеспечивающего направленную доставку НК в клетки-мишени.

Авторы выражают благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку (проект № 13-04-40183 комфи).

Список литературы / References:

1. Templeton N.S. Optimization of nonviral gene therapeutics / In: Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies, 3 ed. / Ed. N.S. Templeton. Boca Raton: CRC Press, 2009. 1120 p.
2. Blau H.M., Springer M.L. // N. Engl. J. Med. 1995. V. 333. P. 1204–1207.
3. Verma I.M., Weitzman M.D. // Ann. Rev. Biochem. 2005. V. 74. P. 711–738.
4. Huang L. Non-viral vectors for gene therapy. 2nd ed. Part 1. / Huang L., Hung M.C., Wagner E. / Advances in Genetics. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. V. 53. 400 p.
5. Lv H.T., Zhang S.B., Wang B., Cui S.H., Yan J. // J. Control. Release. 2006. V. 114. P. 100–109.
6. Morille M., Passirani C., Vonarbourg A., Clavreul A., Benoit J.-P. // Biomaterials. 2008. V. 29. P. 3477–3496.
7. Karmali P.P., Chaudhuri A. // Med. Res. Rev. 2007. V. 27. P. 696–722.
8. Non-Viral Gene Therapy / Ed. X. Yuan. Rijeka: InTech, 2011. 696 p.
9. Mahato R.I. // Adv. Drug Del. Rev. 2005. V. 57. P. 699–712.
10. Tseng Y.-C., Mozumdar S., Huang L. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2009. V. 61. P. 721–731.
11. Spack E.G., Sorgi F.L. // Drug Discov. Today. 2001. V. 6. P. 186–197.
12. Wasungu L., Hoekstra D. // J. Control. Release. 2006. V. 116. P. 255–264.
13. Zuhorn I.S., Engberts J.B.F.N., Hoekstra D. // Eur. Biophys. J. 2007. V. 36. P. 349–362.
14. El Ouahabi A., Ruysschaert J.M. // Molecular Therapy. 2005. V. 11. P. 336–347.
15. Conner S.D., Schmid S.L. // Nature. 2003. V. 422. P. 37–44.
16. Fang J., Nakamura H., Maeda H. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2011. V. 63. P. 136–151.
17. De Laporte L., Cruz Rea J., Shea L.D. // Biomaterials. 2006. V. 27. P. 947–954.
18. Kostarelos K., Miller A.D. // Chem. Soc. Rev. 2005. V. 34. P. 970–994.
19. Серебренникова Г.А., Маслов М.А., Морозова Н.Г. // Вестник МИТХТ. 2011. Т. 6 № 5. С. 72–86.
20. Serebrennikova G.A., Maslov M.A., Morozova N.G. // Vestnik MITHT (Fine Chem. Technologies). 2011. V. 6. № 5. P. 72–86.
21. Srinivas R., Samanta S., Chaudhuri A. // Chem. Soc. Rev. 2009. V. 38. P. 3326–3338.
22. Martin B., Sainlos M., Aissaoui A., Oudrhiri N., Hauchecorne M., Vigneron J.-P., Lehn J.-M., Lehn P. // Curr. Pharm. Design. 2005. V. 11. P. 375–394.
23. Mintzer M.A., Simanek E.E. // Chem. Rev. 2009. V. 109. P. 259–302.
24. Maslov M.A., Zenkova M.A. Non-viral gene delivery systems based on cholesterol cationic lipids: Structure-activity relationships / In: Non-Viral Gene Therapy / Ed. X. Yuan. Rijeka: InTech, 2011. P. 349–380.
25. Hui S.W., Langner M., Zhao Y.L., Hurley E., Chan K. // Biophys. J. 1996. V. 71. P. 590–599.
26. Mok K.W.C., Cullis P.R. // Biophys. J. 1997. V. 73. P. 2534–2545.
27. Kerner M., Meyuhas O., Hirsch-Lerner D., Rosen L.J., Min Z., Barenholz Y. // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1532. P. 128–136.
28. Zuidam N.J., Barenholz Y. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1368. P. 115–128.
29. Zuidam N.J., Hirsch-Lerner D., Margulies S., Barenholz Y. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1419. P. 207–220.
30. Liu Y., Mounkes L.C., Liggitt H.D., Brown C.S.,

- Solodin I., Heath T.D., Debs R.J. // *Nat. Biotech.* 1997. V. 15. P. 167–173.
30. Sternberg B., Hong K., Zheng W., Papahadjopoulos D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1375. P. 23–35.
31. Simberg D., Weisman S., Talmon Y., Faerman A., Shoshani T., Barenholz Y. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 39858–39865.
32. Romberg B., Hennink W.E., Storm G. // *Pharm. Res.* 2008. V. 25. P. 55–71.
33. Martin-Herranz A., Ahmad A., Evans H.M., Ewert K., Schulze U., Safinya C.R. // *Biophys. J.* 2004. V. 86. P. 1160–1168.
34. Song L.Y., Ahkong Q.F., Rong Q., Wang Z., Ansell S., Hope M.J., Mui B. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1558. P. 1–13.
35. Masson C., Garinot M., Mignet N., Wetzler B., Mailhe P., Scherman D., Bessodes M. // *J. Control. Release.* 2004. V. 99. P. 423–434.
36. Sapra P., Allen T.M. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 7190–7194.
37. Molas M., Gómez-Valadés A.G., Vidal-Alabré A., Miguel-Turu M., Bermudez J., Bartrons R., Perales J.C. // *Curr. Gene Ther.* 2003. V. 3. P. 468–485.
38. Brown J., Hunt R. // *Internal. Rev. Cytol.* 1978. V. 52. P. 277–349.
39. Nicolson G., Irimura T. // *Biology of the Cell.* 1984. V. 51. P. 157–164.
40. Biesa C., Lehra C.-M., John F. // *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2004. V. 56. P. 425–435.
41. Aneel A.E. // *Pharm. Technol.* 2003. V. 27. P. 58–62.
42. Ashwell G., Harford J. // *Annu. Rev. Biochem.* 1982. V. 51. P. 531–554.
43. Spiess M. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 10009–10018.
44. Zhang Y., Rong X., Gao Q., Maitani Y., Nagai T. // *J. Control. Release.* 2007. V. 117. P. 281–290.
45. Salvador F., Alin O., Benet M., Dasi F., Crespo J. // *Method. Enzymol.* 2003. V. 373. P. 6876–6879.
46. Erbacher P., Roche A.C., Monsigny M., Midoux P. // *Bioconjugate Chem.* 1995. V. 6. P. 401–410.
47. Barbro N.M., Leonie B., Dirk K., Meijer F., Poelstra K. Cell specific delivery of anti-inflammatory drugs to hepatic endothelial and Kupffer cells for the treatment of inflammatory liver diseases / In: *Drug Targeting: Organ-Specific Strategies* / Eds. G. Molema, D.K.F. Meijer. Wiley-VCH, 2001. V. 12. 381 p.
48. Kawakami S., Munakata C., Fumoto S., Yamashita F., Hashida M. // *J. Pharm. Sci.* 2001. V. 90. P. 105–113.
49. Kawakami S., Yamashita F., Nishikawa M., Takakura Y., Hashida M. // *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 252. P. 78–83.
50. Shigeta K., Kawakami S., Higuchi Y., Okuda T., Yagi H., Yamashita F., Hashida M. // *J. Control. Release.* 2007. V. 118. P. 262–270.
51. Lu Y., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M. // *Biomaterials.* 2007. V. 28. P. 3255–3262.
52. Yeeprae W., Kawakami S., Higuchi Y., Yamashita F., Hashida M. // *J. Drug Target.* 2005. V. 13. P. 479–487.
53. Yeeprae W., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M. // *J. Control. Release.* 2006. V. 114. P. 193–201.
54. Higuchi Y., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M. // *Biomaterials.* 2007. V. 28. P. 532–539.
55. Mukthavaram R., Marepally S., Venkataa M.Y., Vegi G.N., Sistlab R., Chaudhuria A. // *Biomaterials.* 2009. V. 30. P. 2369–2384.
56. Fabio K., Gaucheron J., Di Giorgio C., Vierling P. // *Bioconjugate Chem.* 2003. V. 14. P. 358–367.
57. Ren T., Zhang G., Liu D. // *Bioorg. Med. Chem.* 2001. V. 9. P. 2969–2978.
58. Maslov M.A., Medvedeva D.A., Rapoport D.A., Serikov R.N., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. V. 21. P. 2937–2940.
59. Mahon E., Aastrup T., Barboiu M. // *Chem. Commun.* 2010. V. 46. P. 5491–5493.
60. Lindhorst T.K. Artificial multivalent sugar ligands to understand and manipulate carbohydrate-protein interactions / In: *Host-Guest Chemistry: Mimetic Approaches to Study Carbohydrate Recognition* / Ed. S. Penadés. Springer Berlin Heidelberg, 2002. P. 201–235.
61. Lee Y.C., Lee R.T. // *Accounts Chem. Res.* 1995. V. 28. P. 321–327.
62. Connolly D.T., Townsend R.R., Kawaguchi K., Bell W.R., Lee Y.C. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 939–945.
63. Lee Y.C., Townsend R.R., Hardy M.R., Lönngren J., Arnarp J., Haraldsson M., Lönn H. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. P. 199–202.
64. Lee Y.C., Lee R.T. / In: *Carbohydrates in Chemistry and Biology* / Eds. B. Ernst, G.W. Hart, P. Sinay. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. V. 4. P. 549–561.
65. Lee R.T., Lin P., Lee Y.C. // *Biochemistry.* 1984. V. 23. P. 4255–4261.
66. Biessen E.A.L., Noorman F., van Teijlingen M.E., Kuiper J., Barrett-Bergshoeff M., Bijsterbosch M.K., Rijken D.C., van Berkel T.J.C. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 28024–28030.
67. Schierholt A., Hartmann M., Lindhorst T.K. // *Carbohydr. Res.* 2011. V. 346. P. 1519–1526.
68. Page D., Aravind S., Roy R. // *Chem. Commun.* 1996. V. 16. P. 1913–1914.
69. Vrasidas I., André S., Valentini P., Böck C., Lensch M., Kaltner H., Liskamp R.M.J., Gabius H. J., Pieters R.J. // *Org. Biomol. Chem.* 2003. V. 1. P. 803–810.
70. Dubber M., Patel A., Sadalapure K., Aumüller I., Lindhorst T.K. // *Eur. J. Org. Chem.*

2006. V. 16. P. 5357–5366.
71. Patel A., Lindhorst T.K. // *J. Org. Chem.* 2001. V. 66. P. 2674–2680.
72. Biessen E.A., Vietsch H., van Berkel T.J. // *Circulation.* 1995. V. 91. P. 1847–1854.
73. Sliedregt L.A., Rensen P.C., Rump E.T., van Santbrink P.J., Bijsterbosch M.K., Valentijn A.R., van der Marel G.A., van Boom J.H., van Berkel T.J., Biessen E.A. // *J. Med. Chem.* 1999. V. 42. P. 609–618.
74. Rensen P.C.N., van Leeuwen S.H., Sliedregt L.A.J.M., van Berkel T.J.C., Biessen E.A.L. // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. P. 5798–5808.
75. Carrière M., V. Escriou, Jollet A., Scherman D. // *Drug Delivery.* 2004. V. 11. P. 351–363.
76. Murahashi N., Ishihara H., Sasaki A., Sakagami M., Hamana H. // *Biol. Pharm. Bull.* 1997. V. 20. P. 259–266.
77. Frisch B., Carrière M., Largeau C., Mathey F., Masson C., Schuber F., Scherman D., Escriou V. // *Bioconjugate Chem.* 2004. V. 15. P. 754–764.
78. Ivanova E.A., Maslov M.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Chupin V.V. // *RSC Adv.* 2012. V. 2. P. 4600–4602.
79. Maslov M.A., Ivanova E.A., Morozova N.G., Filatov A.V., Zenkova M.A. // *Book of Abstracts of 18th Eur. Carbohydrate Symposium. Moscow, Russia, August 2–6, 2015.* P. 52.
80. Watanabe T., Umehara T., Yasui F., Nakagawa S.-I., Yano J., Ohgi T., Sonoke S., Satoh K., Inoue K., Yoshida M., Kohara M. // *J. Hepatol.* 2007. V. 47. P. 744–750.
81. Horiuchi S., Aoyama Y. // *J. Control. Release.* 2006. V. 116. P. 107–114.
82. Guermonprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Thery C., Amigorena S. // *A. Rev. Immunol.* 2002. V. 20. P. 621–667.
83. Gogóák P., Réthi B., Hajas G., Rajnavölgyi E. // *J. Mol. Recognit.* 2003. V. 16. P. 299–317.
84. Ribas A., Butterfield L.H., Glaspy J.A., Economou J.S. // *J. Clin. Oncol.* 2003. V. 21. P. 2415–2432.
85. Ribas A. // *Curr. Gene Ther.* 2005. V. 5. P. 619–628.
86. Altin J.G. Liposomes and other nanoparticles as cancer vaccines and immunotherapeutics / In: *Innovation in Vaccinology* / Ed. S. Baschieri. Springer Netherlands, 2012. P. 135–178.
87. Mukhopadhyay A., Basu S.K. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2003. V. 84. P. 183–209.
88. Carrillo-Conde B., Song E.H., Chavez-Santoscoy A., Phanse Y., Ramer-Tait A.E., Pohl N.L., Wannemuehler M.J., Bellaire B.H., Narasimhan B. // *Mol. Pharm.* 2011. V. 8. P. 1877–1886.
89. Mével M., Breuzard G., Yaouanc J.J., Clément J.C., Lehn P., Pichon C., Jaffrès P.A., Midoux P. // *Chembiochem.* 2008. V. 9. P. 1462–1471.
90. Pichon C., Midoux P. // *Methods. Mol. Biol.* 2013. V. 969. P. 247–274.
91. Markov O.V., Mironova N.L., Shmendel E.V., Serikov R.N., Morozova N.G., Maslov M.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // *J. Control. Release.* 2015. V. 213. P. 45–56.
92. Sato A., Takagi M., Shimamoto A., Kawakami S., Hashida M. // *Biomaterials.* 2007. V. 28. P. 1434–1442.
93. White K., Rades T., Kearns P., Toth I., Hook S. // *Pharm. Res.* 2006. V. 23. P. 1473–1481.
94. Copland M.J., Baird M.A., Rades T., McKenzie J.L., Becker B., Reck F., Tyler P.C., Davies N.M. // *Vaccine.* 2003. V. 21. P. 883–890.
95. Proudfoot O., Apostolopoulos V., Pietersz G.A. // *Mol. Pharm.* 2007. V. 4. P. 58–72.
96. Cui L., Cohen J.A., Broaders K.E., Beaudette T.T., Fréchet J.M. // *Bioconjug. Chem.* 2011. V. 22. P. 949–957.